

**DELPHION****RESEARCH****PRODUCTS****INSIDE DELPHION**[Log Out](#) | [My Account](#) | [Saved Searches](#)[My Account](#)Search: [Quick/Number](#) [Boolean](#) [Advanced](#) [Derwent](#)**The Delphion Integrated View**Get Now: ☒ [PDF](#) | [File History](#) | [Other choices](#)Tools: [Add to Work File](#): [Create new Work File](#)View: [INPADOC](#) | Jump to: [Top](#)Go to: [Derwent](#)[Email this to a](#)Title: **JP07107975A2: PURIFICATION OF NUCLEIC ACID AND APPARATUS THEREFOR**Derwent Title: Purification of PCR-amplified nucleic acid - comprises adding isopropyl alcohol and sodium chloride prior to centrifugation ([Derwent Record](#))Country: **JP Japan**Kind: **A**Inventor: **KIYAMA MASAHARU;  
FUJITA TAKESHI;**Assignee: **HITACHI LTD**  
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)Published / Filed: **1995-04-25 / 1993-10-12**Application Number: **JP1993000253964**IPC Code: Advanced: **C07H 1/06; C12N 15/09;**  
Core: **C07H 1/00;** more...  
IPC-7: **C07H 1/06; C12N 15/09;**Priority Number: 1993-10-12 **JP1993000253964**

Abstract: PURPOSE: To provide an apparatus for the concentration, purification and gene analysis treatment of DNA amplified by PCR in gene analysis process and to perform the purification and concentration of DNA in a biospecimen in high yield.

CONSTITUTION: A DNA amplified by PCR amplification is concentrated and purified from a reaction liquid subjected to PCR amplification and the DNA is used in an enzymatic reaction. In the above process, the concentration and purification are carried out by adding isopropyl alcohol and sodium chloride to the reaction liquid and applying a centrifugal acceleration to the mixture.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

Family: None

Other Abstract Info: [DERABS C95-190175](#) [DERC95-190175](#)[Nominate this for the Gallery...](#)

Copyright © 1997-2007 The Thomson Corp

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-107975

(43) 公開日 平成7年(1995)4月25日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

C 1 2 N 15/09

C 0 7 H 1/06

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

9050-4B

C 1 2 N 15/ 00

A

審査請求 未請求 請求項の数2 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平5-253964

(22) 出願日 平成5年(1993)10月12日

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72) 発明者 木山 政晴

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会

社日立製作所基礎研究所内

(72) 発明者 藤田 毅

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会

社日立製作所基礎研究所内

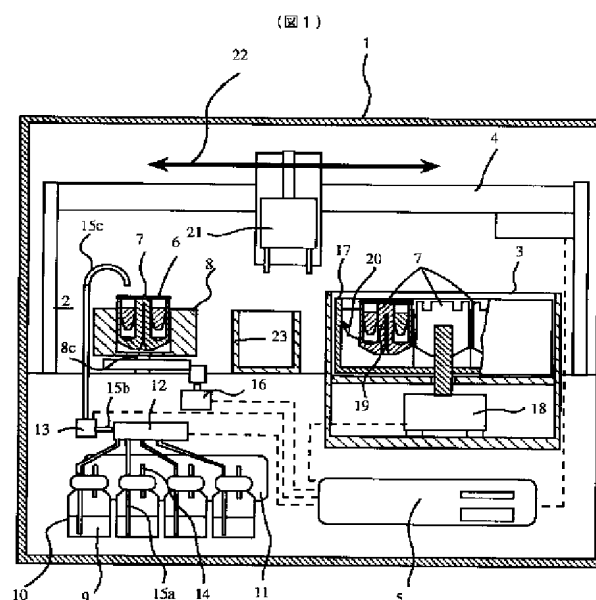
(74) 代理人 弁理士 小川 勝男

(54) 【発明の名称】 核酸の精製方法及び装置

(57) 【要約】

【目的】 遺伝子解析方法におけるPCR増幅されたDNAを濃縮、精製及び遺伝子解析処理を行なう装置に関し、特に生体試料中のDNAの精製及び濃縮を高収率に行なうこと。

【構成】 PCR増幅を行なった反応液よりPCR増幅により増幅されたDNAを濃縮及び精製し、酵素反応を行なう手段において、該反応液にイソプロピルアルコールと塩化ナトリウムを混合し、次いで遠心加速度を与えて、濃縮及び精製を行なう。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】PCR増幅を行なった反応液よりPCR増幅により増幅されたDNAを濃縮及び精製し、酵素反応を行なう方法において、該反応液にイソプロピルアルコールと塩化ナトリウムを混合し、次いで遠心加速度を与えて濃縮及び精製を行なうことを特徴とする遺伝子精製方法。

【請求項2】PCR増幅を行なった反応液を保持する容器をハンドリングする搬送機構と液体を分注する分注装置と、遠心分離機と、該搬送機構と該分注機構と該遠心分離機をコントロールする制御機構とを具備する遺伝子解析装置において、イソプロピルアルコールと塩化ナトリウム水溶液をそれぞれ貯蔵する容器を具備し、前記反応液にイソプロピルアルコールと塩化ナトリウムを混合し、次いで遠心加速度を与えて濃縮及び精製を行なう工程を前記制御機構により実行すべく構成されていることを特徴とする遺伝子解析装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、遺伝子解析方法におけるPCR増幅されたDNAを濃縮、精製及び遺伝子解析処理を行なう方法および装置に関し、特に生体試料中のDNAの塩基配列を調べる前処理の技術に関する。

## 【0002】

【従来の技術】微量な生体試料中の任意の塩基配列領域を選択的に増幅する技術に、特開昭61-274697に示すPCR(Polymerase Chain Reaction)法がある。この技術は目的のDNA領域を、目的領域を挟む両端の核酸断片を用いて、DNAポリメラーゼによる鋳型伸長反応を繰り返すことで約10<sup>6</sup>倍に増幅し、試料中にただ1つの標的部位でも増幅することが出来る。一方核酸の塩基配列決定技術は、従来M13ファージに調べたいDNA断片を挿入し、大腸菌の自己増殖を利用しM13ファージの増幅を行ない、これを鋳型としてサンガー法でシーケンス反応を行ない、ゲル電気泳動法を用い塩基配列決定を行なっていた。

【0003】しかしPCR増幅が発明されると、PCR増幅を応用してシーケンス反応の鋳型を調製することができるようになった。この方法をPCRダイレクトシーケンス法と呼び、特に目的領域を挟む両端の核酸断片の混入量を同量とせず、極端な非対称量とし、シーケンス時の鋳型となる一本鎖DNAを得る方法は非対称PCR増幅と呼ばれ、これにはブローディング ナショナル アカデミー オブサイエンス オブ ユー. エス. エー85, (1988年)第7652頁から7659頁(Proceeding National Academy of Science of U. S. A. 85, (1988) pp 7652-7656)の報告がある。

【0004】この報告では、調べたい遺伝子領域の塩基

配列の決定を目的に、遺伝子領域の両端にそれぞれ相補的な配列を持つ核酸断片(プライマ)によって、目的の遺伝子領域をPCR増幅した後、膜分離を行ないPCR増幅反応液から未反応のプライマ及びヌクレオチド三リン酸を除去する精製と、増幅されたDNAの濃縮を行なっている。この膜分離法を説明すると、通常使用するプライマの長さが、20塩基から40塩基でありその分子量はほぼ10,000であり、一方PCR増幅された二本鎖DNAは200から1,000塩基対であり、分子量約300,000である。よって一般的には図3に模式的に示すように、分子量30,000の分画性能を持つ限外ろ過フィルタ23を0.5ml容量の容器24に取り付け、これにPCR反応後の反応液25をいれ、容器24をはめあい容器26に入れ、5000×gの遠心加速度27を与えれば、PCR増幅したDNA28は限外ろ過フィルタ23を設けた容器24に残り、プライマ及びヌクレオチド三リン酸を含む反応液29ははめあい容器26に落ちる。この容器24に残ったPCR増幅したDNAを鋳型として、サンガー法により塩基配列を決定している。プライマを分離する理由は、サンガー法において、シーケンス反応時に用いるプライマと、PCR増幅に用いたプライマが共存すると、鋳型への結合反応が競合しシーケンス反応を阻害するためであり、ヌクレオチド三リン酸を分離する理由は、PCR増幅時のヌクレオチド三リン酸濃度は、シーケンス反応におけるヌクレオチド三リン酸濃度よりも高濃度であるので、シーケンス反応時の反応液組成が変化し、良好な塩基配列決定が行なうことが出来なくなるためである。

【0005】膜分離を用いない方法には、細胞工学8, 6, (1989年)第545頁-第553頁に記載のイソプロピルアルコールを用いる有機溶媒法がある。これはPCR増幅後の反応液に、0.5倍量の4M酢酸アンモニウムと2.5倍量のイソプロピルアルコールを反応液に混合し、次いで10000×gの遠心加速度を与え、容器内に残ったDNAを得る方法が記載されている。またバイオテクニクス8, 2, (1990年)第184頁-第189頁(BioTechniques 8, 2, (1990) pp 184-189)に記載の方法は、上記の報告の塩を酢酸ナトリウムに変えて精製濃縮を行なっている。一般的にDNAの濃縮にはエタノールを使用するが、エタノールでは核酸がすべて沈殿するため、プライマと増幅したDNAを分離出来ない。これを解決するために前記両報告はイソプロピルアルコールを用い精製濃縮を行なっている。その理由はイソプロピルアルコールはエタノールよりも水との親和性が低く、DNAの溶解度が高いため、短鎖の核酸は水成分に溶解し、長鎖のDNAは沈殿するためである。これにより短鎖であるプライマと長鎖である増幅したDNAを分離することが出来る。

【0006】また有機溶媒を用いない他の方法には、ゲ

ル電気泳動法を用いてPCRの増幅産物を分離し、エチジウムブロミド (E t B r) で染色し、目的のDNAをゲルごと切り出して、次いでフェノール抽出して精製する方法がある。

【0007】一方これら精製濃縮操作は操作者にとって煩雑であり自動化が望まれているが、未だ発明されていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】塩基配列決定は、サンガー法等のシーケンス反応と、ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動からなり、シーケンス反応時における鋳型DNAの量は、電気泳動時の検出感度に大きく影響を与え、塩基配列決定結果の可否を大きく左右させる。PCR増幅によって十分な鋳型DNAの生成があっても、精製濃縮の過程での鋳型DNAの損失が多いと十分な結果が得られない。本発明の目的は、シーケンス反応に最良な鋳型DNAを供給することであり、これには精製濃縮過程での鋳型の損失を低減する手段を設ける必要がある。従来の精製濃縮方法において、膜分離法を用いた場合回収率は低く、鋳型DNAの損失は免れない。これは目的のDNAが膜に吸着するためであると考えられる。一方ゲルを用いた精製方法では、PCR増幅時に目的のDNA以外の生成があっても、確実に目的のものだけをシーケンスの鋳型として得ることが出来る利点があるが、ゲルを準備する手間と切り出し及び精製の手間が係り、容易に精製することが出来ない。またゲルを認識するため用いるE t B rが、目的のDNAに挿入され、シーケンス反応に悪影響をおよぼす。

【0009】一方有機溶媒を用いる方法は、特別な器具を用いないことと操作が簡便であるため、容易に用いられるが、従来報告されている条件下では、回収率が70から50%程度であり、回収量が低いという欠点があった。

【0010】一方これらの精製濃縮操作の自動化を考慮した場合、簡便且つ高回収率のプロセスを提供しこれを実行する装置の開発が急務である。上記の各操作を自動化した場合、有機溶媒を用いる方法は最も操作が簡便であるので、自動化に適している。よって従来の有機溶媒法について、高回収且つ塩基配列決定操作における良好な結果が得られるよう改善することが本発明の課題である。

【0011】

【課題を解決するための手段】上記課題を達成するために、本発明者らは鋭意研究の結果、イソプロピルアルコールを用いた有機溶媒法の、塩の種類と塩濃度を最適化することによって、DNAの回収率が90%以上となる方法を発明するに至った。すなわち本発明を要約すると、PCR増幅を行なった反応液より、PCR増幅され特定配列を持つDNAを濃縮及び精製する手段において、該反応液にイソプロピルアルコールと塩化ナトリウ

ムを混合し、次いで遠心加速度を与えて、精製及び濃縮を行なう方法が最もシーケンス反応の良好な結果が得られる方法であることを見出すに至った。

【0012】本発明を更に詳述する。本発明を適用し精製されるべきDNAは、PCR増幅によって増幅された生成物である。その塩基長は、100塩基以上3000塩基以下であり、一本鎖DNA、二本鎖DNAのいずれにも用いることが出来る。そのPCR増幅の反応条件は論文等に記載されている条件で良く、一般的には終濃度がそれぞれ10mM Tris-HCl (pH8.0), 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01%ゼラチン, 0.25mMの各dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2.5unit 耐熱性DNAポリメラーゼと、所定量のプライマ及び鋳型DNAである。鋳型DNAは抽出動物組織、菌体、培養細胞などから得られた凍結、新鮮或はホルマリン等で固定した検体を、プロテアーゼによる蛋白質の分解し、フェノール或はクロロフォルム抽出による除蛋白、エタノール沈殿法による精製濃縮からなる抽出方法に従って得られたDNA、及び大腸菌内に移入されたプラスミドを変性剤やリゾチームによって膜蛋白を可溶化し、アルカリ法を用いて抽出されるDNAである。

【0013】上記の反応液をPCR増幅の温度サイクルに保持し、増幅DNAを得ることが出来る。温度サイクルは、目的の領域の塩基配列や塩基長、及び鋳型DNAの量や純度によって最適な条件が変化するが、一般的には94度1.5分、次いで、37度から60度1.5分、次いで70度から75度を1分の温度サイクルを20から40サイクル行なわれる。試薬はGene Amp DNA Amplificationキット(シータス社)が良く使用されるが、これらの試薬に準拠する物であれば、DNAポリメラーゼを含めメーカーを問わず使用可能である。また反応液量も、操作者の仕様に依じて適宜変更することが出来、便宜上50μlから100μlが一般的である。

【0014】本発明の精製濃縮方法は以下の手順で行なわれる。上記方法によって増幅し産生したDNAを含む反応液を1.5ml容量の容器に移し、これに終濃度が1Mとなる塩化ナトリウム(NaCl)及びイソプロピルアルコールを50%となるよう注入し、混合し、次いで遠心加速度10000×gを30分間与える。この後容器を180度反転し上清を捨てる(上清を捨てる操作をデカンテーションという)。次いでこの容器に70%エタノールを静かに分注し、次いでデカンテーションし、これらを2、3回繰り返す。次いで、遠心乾燥器と負圧源によって容器内を乾燥させたのち、容器内のDNAを鋳型として常法によってシーケンス反応を行ない、良好な塩基配列決定や各種の酵素処理を行なうことが出来る。上記の各試薬の量は一例を述べたものであり、終濃度として調製すべき試薬の量は、少なくとも0.5M

以上のNaCl及び50%程度のイソプロピルアルコールによって、本目的は達成される。

【0015】また本発明を実行する自動化装置は、液体を保持する容器をハンドリングする搬送機構と、液体を分注する分注装置と、遠心分離機と、該搬送機構と該分注機構と該遠心分離機をコントロールする制御機構とを具備し、イソプロピルアルコールと塩化ナトリウム水溶液をそれぞれ貯蔵する容器を具備し、該制御機構が上記の精製濃縮プロセスを実行するよう構成されている。

【0016】

【作用】従来法と比較して、酢酸アンモニウム或は酢酸ナトリウムに変えて塩化ナトリウム(NaCl)を使用すれば、イオン強度が高くなり、PCR増幅によって生成したDNAがより凝集しやすくなり、イソプロピルアルコール溶液中でより沈殿しやすくなり、回収率が向上し、塩基配列決定においても良好な結果が得られる。

【0017】また本発明を実行する自動装置を使用すれば、省力化に貢献するだけでなく、良好な試料調製を再現性良く行なうこと、及び多サンプルであっても処理可能である。

【0018】

【実施例】

実施例1

本発明の一実施例を以下に示す。

【0019】本実施例で採用した遺伝子前処理プロセスのフローを図4に示す。本実施例は調べたいDNA領域を持つ生体からDNAを抽出する工程30、次いで抽出したDNAから調べたいDNA領域を選択的に増幅するPCR増幅工程31、次いで増幅したDNA領域を精製濃縮する工程32、次いで精製濃縮されたDNAを塩基配列決定できるようシーケンス反応する工程33、次いで電気泳動による塩基配列決定を行なう工程34からなる。本発明は本実施例では精製濃縮工程32内に適用されている。以下、各工程についてヒト白血球抗原(HLA)遺伝子のDQ $\alpha$ 領域の塩基配列決定を行なった場合を用いて詳述する。

【0020】1. 生体からのDNAの抽出工程

生体試料からのDNAの抽出精製プロセスについて説明する。全血50 $\mu$ lで容量1.5mlの容器に入れ、これに蒸留水1mlを加え、ボルテックスミキサーにより混合し溶血させ、10000 $\times$ gで1分間遠心分離した後、上清をデカンテーションし沈殿物を得る。これに再度蒸留水を加え、溶血、遠心分離、デカンテーションの操作により沈殿物を得る。この沈殿物にTNEバッファ(10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA (pH8.0), 100mM NaCl) 90 $\mu$ l、10%ドデシル硫酸ナトリウム10 $\mu$ l、10mg/ml プロテイナーゼK (MERCCK社) 5 $\mu$ lを加え、50℃で1時間インキュベートし、次いで溶液にフェノール・クロロフォルム溶液(水飽和フェノール:水

飽和クロロフォルム(1/24イソamilアルコール添加)=1:1)100 $\mu$ lを加え、ボルテックスミキサーによって混合を行い、その後10000 $\times$ gで10分間遠心分離し、水層部をピペットにより吸引し他の容器に移す(フェノール・クロロフォルム抽出)。このフェノール・クロロフォルム抽出を2回行った後、水層の30%(体積比)量の3M NaCl水溶液と水層量の2.5倍量の99.5%エタノールを加え、10000 $\times$ gで20分間遠心分離を行う(エタノール沈殿)。この後上清をデカンテーションし、容器底に沈殿したペレット状のDNAに対して静かに80%エタノール水溶液を200 $\mu$ l加え、10000 $\times$ gで3分間遠心分離し、上清をデカンテーションする(エタノールリンス)。この後遠心乾燥器と負圧源であるアスピレータによって、容器内の残ったエタノール水溶液を蒸発させDNAを得る。乾燥後DNAを100 $\mu$ lのTEバッファ(10mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA)に溶解する。上記述べたDNAの抽出方法は、一例を示したものであり本方法以外には、グノミックアイソレーションキット(ベーリンガーマンハイム社)を用いる方法も可能であり、上記の方法に限定されない。

【0021】2. PCR増幅工程

目的DNAのPCR増幅について説明する。PCR反応液は、50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01%ゼラチン(終濃度)、及び各20nmolのデオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)、所定量(ここでは各20pmol)の2種類のプライマを混合した。プライマの配列は、プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス ユー. エス. エー 85, (1988) 第7652頁-第7656頁(Proceeding National Academy of Science of U. S. A.) 85, (1988年) pp. 7652-7656)に記載の、GH26及びGH27を合成し用いた。これに上記抽出したゲノムDNAを10 $\mu$ l(抽出量の1/10量; 約50から100ng)加え、全量で100 $\mu$ lとした後、耐熱性DNAポリメラーゼ(Taqポリメラーゼ)を加える。次いで反応液の蒸発防止のために鉱物油を60 $\mu$ l程加える。この反応液をサーマルサイクラー(シータス社)にて反応させた。反応時間は、94度1.5分、55度1.5分、72度1.2分のサイクルを30サイクル行なった。

【0022】次いで、シーケンス反応時に必要な一本鎖の鋳型を調製するため、二回目のPCR増幅を行なった。詳述すると、本実施例ではシーケンス時に蛍光式シーケンサを用いたため、シーケンス時のプライマには蛍光色素を付加したプライマを用いる必要がある。このプライマの配列はHLAの領域に相補的でないので、一回

目のPCR増幅後の二本鎖DNAを直接シーケンス反応を行なうことは出来ない。よってこの二本鎖DNAにシーケンス反応時に用いるプライマの配列を取り込ませる必要があり、一回目の増幅に用いたプライマにシーケンス反応時に用いるプライマの配列を付加したプライマ（アンカープライマ）を合成し二回目のPCR増幅を行った。この方法は、クリニカル ケミストリ 35, 11 (1989年) 第2196頁-第2201頁 (Clinical Chemistry 35, 11 (1989) pp2196-2201) に記載されている。アン

カープライマGH27UNIの配列を以下に示す。  
【0023】GH27UNI: 5' -CGTTGTAAACGACGGCCAGTGGTAGCAGCGGTAGAGTTG-3'

二回目のPCR反応液の組成は、一回目のPCR増幅後の反応液1μlを入れ、GH27UNI 1pmol及び、GH26 10pmolを混入させ、他の組成は一回目の組成と同じである。この反応液を94度1分、57度1.5分、72度1分の温度サイクルを18サイクル反応させた。

#### 【0024】3. 精製濃縮工程

二回目のPCR増幅を行なった産物を精製濃縮した。反応液から鉱物油を取り除き、反応液量100μlに対し、50μlの3M NaCl水溶液を加え、これに150μlのイソプロピルアルコールを加え、混合かくはん後、卓上遠心機で10000×gで30分間遠心分離する。この後、上清をデカンテーションし、ペレット状のDNAに対して前述のエタノールリンス操作を2回繰り返して行う。次いで、遠心乾燥機とアスピレータで残存した上清を乾燥後、10μlの滅菌脱イオン化蒸留水に溶解する。本発明を従来法と比較するため、同様にPCR増幅を行なった反応液に、本発明と同条件となるように酢酸アンモニウム水溶液とイソプロピルアルコールを加え、同様の操作を行なった。

\*【0025】精製濃縮結果を図5及びゲル中で分離したDNAの量を測定した結果を表1に示す。

【0026】図5は、上記滅菌脱イオン化蒸留水10μlに溶解したDNAを1μlと、電気泳動用色素(30%グリセロール、0.01%キシレンシアノール、0.02%ブロモフェノールブルー)2μl、および滅菌脱イオン化蒸留水9μlを混合し、2%アガロースゲル(宝酒造)に注入し、ミュールビッド(アドバンス社)なる電気泳動装置にて電気泳動した結果である。泳動条件は100V、40分であり、泳動後1ng/ml EtBr液にゲルを10分間染色し、紫外線を照射して、EtBrの発光波長590nmを観察した。マーカーはpHY300PLKの制限酵素HindIIIの分解物とHaeIII分解物、及びpHY300PLKダイマープラスミドのHaeIII分解物とを混合したもので、総量0.1μg混入し、図の左方にその塩基長を記載する。ゲルにはそれぞれ、濃縮にNaClを使用したサンプル、酢酸アンモニウムを使用したサンプル、またPCR増幅後の未精製サンプルを10%(計算上回収率100%の精製濃縮サンプルと同量)を泳動した。未精製サンプルを泳動したレーンの下方に観察されるDNAはプライマであるが、これ以外のDNAではいずれもDNAのバンドは二本(非対称PCR増幅によって一本鎖DNAと二本鎖DNAが産生されたことを意味する)に見られ、マーカーの267塩基長と付近に位置し、目的のDNA領域(242塩基長)と良く一致する。図のDNAのバンドの濃さの比較より、NaClを使用したサンプル1が酢酸アンモニウムを使用したサンプルよりも多くなっている。表1は図5のそれぞれのDNA量をマーカーのDNA量より算出した測定結果であるが、これより未精製サンプルと比較し、塩化ナトリウムの回収率は95%であり、酢酸アンモニウムの回収率は68%であった。

【0027】

\*【表1】

(表1)

サンプル 項目	未精製	酢酸アンモニウム	塩化ナトリウム
DNA重量(ng)	350	238	332
回収率(%)	100	68	95

サンプル----PCR増幅後の10%を比較

回収率----未精製サンプルを基準としたときの回収率

#### 【0028】4. シーケンス反応工程

シーケンス反応のプロセスを説明する。

【0029】精製濃縮したPCR産物をTaqシーケンスキット(宝酒造)と、DNAシーケンサSQ3000(日立)を用いて塩基配列決定を行なった。シーケンス

反応方法はキット添付のプロトコルによりサイクルシーケンス法に従い行なった。シーケンス反応液の組成は、上記の方法で精製濃縮された鋳型DNA10μl、10mM Tris-HCl(pH8.5)、6mM MgCl<sub>2</sub>、2pmol蛍光標識プライマ、1単位のTaq

ポリメラーゼを加え全量を $15\mu\text{l}$ としたものであり、次いで4本の容器に $3.5\mu\text{l}$ 分配し、各容器にそれぞれターミネーション溶液（所定量比で4種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸および各一種類のダイデオキシリボヌクレオチド三リン酸を混合したもの）を $1\mu\text{l}$ 加え、鉍物油を適量入れて、サーマルサイクラーにて、 $94^{\circ}\text{C}$ 30秒、 $60^{\circ}\text{C}$ 1分、 $72^{\circ}\text{C}$ 45秒のサイクルを、15サイクル行なった。上記蛍光標識プライマは有機合成薬品より購入し、その配列は以下の通りであり、5'より3塩基内側の塩基にFITC（フルオレセインイソチオシアネイト）を結合させている。

【0030】5'-CGTTGTAAACGACGGCCAGT-3'

#### 5. 電気泳動による塩基配列決定

シーケンス反応終了後、反応液 $4.5\mu\text{l}$ を採取し、 $2\mu\text{l}$ のキット添付のストップ溶液と混合して、DNAシーケンサのゲルにロードした。電気泳動は、4.5%ポリアクリルアミドとホウ酸バッファを混合し重合させたゲルを用い、泳動条件は $65\text{V}/\text{cm}$ で300分泳動を行ない、塩基配列決定を行なった。結果を図6に示す。図はA（アデニン）の泳動状態を、上記の精製濃縮方法で、塩の違いを検討したサンプルについて調べた結果である。図6（a）のパターンは塩化ナトリウムを使用した鋳型DNAで、図6（b）のパターンは酢酸アンモニウムを使用した鋳型DNAである。縦軸は蛍光強度を示し、横軸は泳動時間を示す。図よりNaClを使用したサンプルが、酢酸アンモニウムを使用したサンプルよりも、強い蛍光強度が測定されている。図中122分に位置する蛍光ピークを両者で比較すると、NaClを使用したサンプルの蛍光強度を1としたときの、酢酸アンモニウムを使用したサンプルの強度比は0.65であった。これに対し精製濃縮後の両者のDNA回収量の比較（表1）では、0.7であったことより考察すれば、NaClを用いた場合、シーケンス反応においても何らかの助長効果があるか、或は酢酸アンモニウムはシーケンス反応を阻害する効果があることが示唆される。本実施例では、Taq DNAポリメラーゼを使用したサイクルシーケンス反応について記したが、T7 DNAポリメラーゼなど、他の酵素を用いてのシーケンシング反応も同様の結果であった。

#### 【0031】実施例2

本発明の精製濃縮操作を実行する自動化装置の一実施例の概略を図1に示す。本実施例の機構を説明すると、本装置は筐体1内に分注機構2、遠心分離機3、搬送機構4、及び制御機構4が構成され、液体を保持する容器6は、4本単位にバケット7内に保持される。

【0032】分注操作を説明する。分注機構2は、ターンテーブル8と試薬9を保持する試薬ボトル10と、圧力タンク11、試薬切り替え弁12、電磁弁13、送気チューブ14、送液チューブ15a～cからなる。送気

チューブ14は試薬ボトル10と（図面奥向きに）圧力タンク11と連結し、圧力タンク11内の正圧で、恒に圧力が掛かっている。送液チューブ15aはその一端が試薬ボトル10内の試薬9に浸漬され、もう一端は試薬切り替え弁12を連結し、試薬切り替え弁12は、電磁弁13に送液チューブ15bで連結され、送液チューブ15cの一端は電磁弁13に連結され、もう一端は開放され、その開放口の下方に容器6が設置されている。バケット7は搬送機構4によりターンテーブル8に設置され、ターンテーブル8はモータ16の駆動により中心軸8aを中心に回転し、位置決めできる。分注操作は次のように行なわれる。ターンテーブル8上の容器6の一つを、開放口の下方に位置させた後、電磁弁13を指定時間開放すれば、試薬切り替え弁12で指定されている試薬9が、圧力タンク11内の圧力によって、送液チューブ15a、試薬切り替え弁12、送液チューブ15b、電磁弁13、送液チューブ15cを介して、容器6内に分注することが出来る。なお試薬ボトル10は、4個設置されそれぞれにイソプロピルアルコール、塩化ナトリウム、70%エタノール、滅菌脱イオン化蒸留水が、所定量保持され、試薬切り替え弁12によって、選択することが出来る。

【0033】遠心操作を説明する。遠心分離機3は、バケット7を4個保持することが出来るロータ17を具備し、ロータ17はモータ18に連結されている。バケット7はロータ17の鋼線19に引っ掛けており、矢印20方向にスイングすることが出来る。モータ18は低速回転でロータ17の位置決めを行なうことが出来、搬送機構4によるバケット7の設置時に所定の位置にバケット7を設置することが出来る。またバケット7を設置後、モータ18の回転を正転と逆転させると、バケット7をスイングすることより、容器6内の液体を混合することが出来る。またこの遠心分離機3は高速回転し、容器6内の液体を遠心分離することが出来る。

【0034】容器の搬送方法を説明する。ターンテーブル8及び遠心分離機3の所定の位置にあるバケット7はハンド21に保持され、矢印22方向に移動し、所定の位置に搬送することが出来る。なおこのハンド21はバケット7を保持し、バケット7を180度反転することが出来、廃棄口23上で、バケット7を反転すれば、容器6内の液体をデカンテーションすることが可能である。

【0035】本装置の駆動方法を説明する。分注機構2、遠心分離機3、搬送機構4は制御機構5によって精製濃縮操作をシーケンシャルに実行することが出来る。本装置における精製濃縮操作手順を図2に示す。

【0036】なお上記実施例は、ヒト遺伝子領域の塩基配列決定の場合について述べたが、本発明の適用範囲はこれにとどまるものでなく、生体試料は動植物、及びウイルス真菌を問わず用いることが可能であり、PCR増

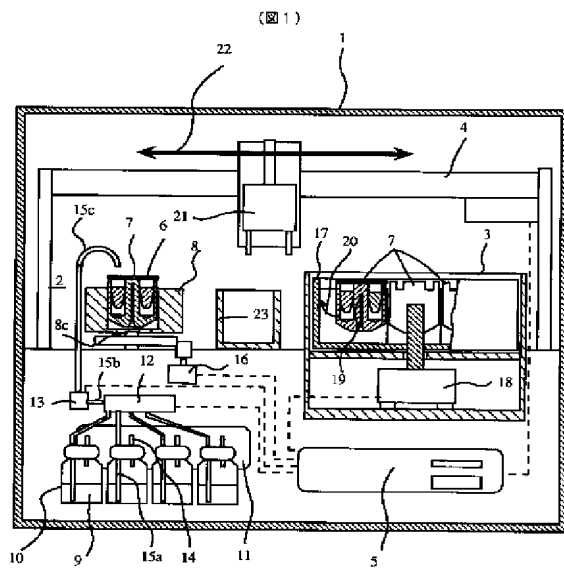
幅から塩基配列決定のプロセスにおいて様々に適用されることは言うまでもなく、本発明はこれらの実施例によって何等限定されるものではない。

# 【0037】

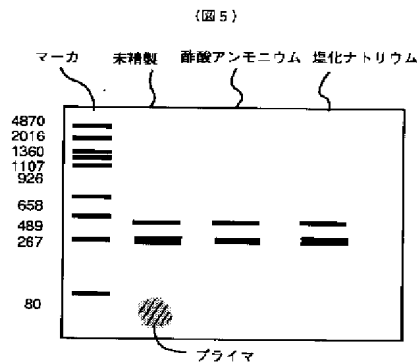
【発明の効果】本発明によれば、PCR増幅を行なった反応液より、PCR増幅によって生成したDNAを精製及び濃縮を高収率行ない、且つ塩基配列決定や各種酵素反応において、良好な結果を得ることが可能である。また本発明を実行する自動装置を使用すれば、省力化に貢献するだけでなく、良好な試料調製を再現性良く行なうこと、及び多サンプルであっても処理可能であるので、研究開発分野或は、多数検体試料を扱う必要のある臨床検査や食品検査等の検査分野において、迅速且つ簡便に遺伝子解析を行なうことが出来その有用性は極めて高い発明である。

\*

【図1】



【図5】



# \*【0038】

【図面の簡単な説明】

【図1】本実施例の装置構成図である。

【図2】本実施例の装置が実行するプロセスのフローチャートである。

【図3】本発明の従来技術の膜分離法を示す図である。

【図4】本発明の実施例を示すフローチャートである。

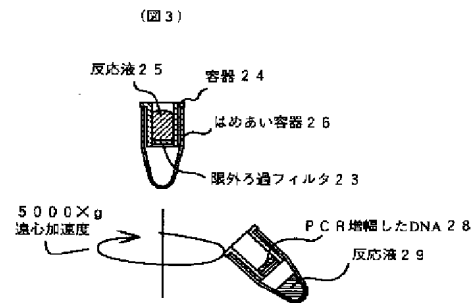
【図5】本発明の精製濃縮処理の結果を示す図である。

【図6】本発明の実施例を塩基配列決定と比較した図である。

【符号の説明】

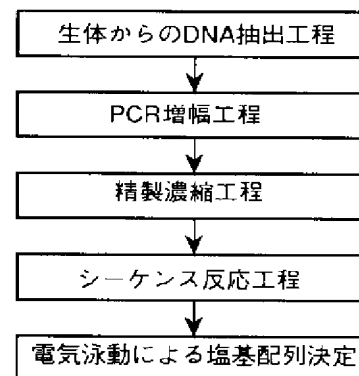
1：筐体 2：分注機構 3：遠心分離機 4：搬送機構 5：制御機構 6：容器 7：パケット 8：ターンテーブル

【図3】



【図4】

(図4)





【図2】

(図2)

PCR増幅後の反応液  $100\mu\text{l}$  容器6に入れる (16サンプル) {手操作}  
 容器6をバケット7に設置 {手操作}  
 バケット7をロータ17に設置 {手操作}  
 ターンテーブル8に移動 (搬送機構4)  
 3M 塩化ナトリウム水溶液  $50\mu\text{l}$  分注 (分注機構2)  
 イソプロピルアルコール  $150\mu\text{l}$  (分注機構2)  
 遠心分離機3に移動 (搬送機構4)  
 混合 (遠心分離機3)  
 遠心分離  $10000\times g$  30分 (遠心分離機3)  
 廃液受け23へ移動 (搬送機構4)  
 デカンテーション (搬送機構4)  
 ターンテーブル8へ移動 (搬送機構4)  
 70%エタノール  $200\mu\text{l}$  分注 (分注機構2)  
 遠心分離機3に移動 (搬送機構4)  
 遠心分離  $10000\times g$  3分 (遠心分離機3)  
 廃液受け23へ移動 (搬送機構4)  
 デカンテーション (搬送機構4)  
 ターンテーブル8へ移動 (搬送機構4)  
 70%エタノール  $200\mu\text{l}$  分注 (分注機構2)  
 遠心分離機3に移動 (搬送機構4)  
 遠心分離  $10000\times g$  3分 (遠心分離機3)  
 廃液受け23へ移動 (搬送機構4)  
 デカンテーション (搬送機構4)  
 ターンテーブル8へ移動 (搬送機構4)  
 乾燥  
 滅菌脱イオン化蒸留水  $10\mu\text{l}$  分注 (分注機構2)

【図6】

(図6)

